

THESIS

BONN 1969

**MILCHSÄURE IN HIRNTUMOREN UND
NICHT-NEOPLASTISCHEN GEWEBEN**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von
BURKHARD HEUSSEN
aus
DÜSSELDORF

BONN 1969

MILCHSÄURE IN HIRNTUMOREN UND
NICHT-NEOPLASTISCHEN GEWEBEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von
BURKHARD HEUSSEN
aus
DÜSSELDORF

BONN 1969

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

Referent : Professor Dr. Peter Röttgen

Tag der mündlichen Prüfung : 25. 3. 1969

Aus der Neurochirurgischen Universitätsklinik Bonn

Direktor : Professor Dr. Peter Röttgen

Druck : Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität B o n n

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

I. EINLEITUNG	Seite
a) Glykolyse und Milchsäure	6
b) Anaerobe Glykolyse und Tumorstoffwechsel	11
c) Aufgabe der vorliegenden Arbeit	14
II. MATERIAL und METHODEN	
a) Gewebe	17
b) Reagenzien	18
c) Bestimmung der Milchsäure nach BARKER und SUMMERSON	19
d) Überprüfung der Methode nach BARKER und SUMMERSON	22
e) Bestimmung der Milchsäure mit Lactatdehydrogenase nach SCHOLZ	27
III. ERGEBNISSE	
a) Milchsäurekonzentration in Hirntumoren und Bezugsgeweben, gemessen nach BARKER und SUMMERSON	30
b) Einfluß verschiedener Zeitfaktoren auf die Milchsäurekonzentrationen in Hirntumoren und Bezugsgeweben	35
c) Milchsäurekonzentrationen in Hirntumoren und Bezugsgeweben, gemessen nach SCHOLZ	41
IV. DISKUSSION	45
V. ZUSAMMENFASSUNG	57
VI. LITERATURVERZEICHNIS	58

I. E I N L E I T U N G

a) Glykolyse und Milchsäure

Endprodukt der anaeroben Glykolyse in tierischen Zellen ist die Milchsäure (1,2). Glucose wird aus dem Blut aufgenommen und in einem mehrstufigen Prozeß in zwei C_3 -Einheiten gespalten. Vermag eine Zelle diese C_3 -Einheiten nach Decarboxylierung in Acetyl-Coenzym A zu überführen und in den Citratzyklus einmünden zu lassen und vermag sie darüber hinaus Sauerstoff aufzunehmen, um den im Citratzyklus frei werdenden Wasserstoff in der Atmungskette energiebringend zu "verbrennen", so spricht man von aerober Glykolyse. Bleibt der Glucoseabbau hingegen bei den C_3 -Einheiten, d.h. schließlich bei der Milchsäure stehen, so handelt es sich um anaerobe Glykolyse. Andere biochemische Wege zur Bildung von Milchsäure fallen im tierischen Organismus weniger ins Gewicht. Eine hohe Milchsäurekonzentration im Gewebe zeigt somit notwendig eine hohe anaerobe Glykolyse an. Eine Zelle glykolyisiert und atmet, um die zum Leben notwendige Energie zu gewinnen. Der Weg bis zu einer bestimmten C_3 -Einheit (Pyruvat) ist bei anaerober und aerober Glykolyse identisch, übrigens auch in pflanzlichen Zellen. Bei der alkoholischen Gärung durch Hefezellen wird das Pyruvat zu Alkohol abgebaut.

Gegenüber der aeroben Glykolyse liefert die anaerobe nur einen kleinen Bruchteil biologisch verwertbarer Energie. Der Nutzungsgrad der anaeroben Glykolyse ist um ein Vielfaches geringer als der Weg der "oxydativen Phosphorylierung", der aeroben Glykolyse.

Zur Gewinnung einer gleichen Energiemenge muß bei anaerober Glykolyse wesentlich mehr Glucose herantransportiert und verarbeitet werden als im aeroben Falle. Die anaerobe Glykolyse ist also als ein weitaus primitiverer Weg der Nahrungsverwertung anzusehen. Sie könnte entwicklungsgeschichtlich in jener Zeit metabolischer Hauptweg gewesen sein, in der die Erde noch eine reduzierende Uratmosphäre besaß, d.h. als noch kein Atmungssauerstoff zur Verfügung stand.

Viele Zellen, die bei genügendem Sauerstoffangebot die Nahrungsstoffe aerob verwerten, also normalerweise "atmen", sind im Falle einer temporären Hypoxie jedoch in der Lage, sich auf dem der oxydativen Nahrungsverwertung (Citratzyklus und Atmungskette) vorgeschalteten anaeroben Wege mit der notwendigen Energie zu versorgen (fakultative Anaerobier). Das bekannteste Beispiel ist die Muskelzelle. Man spricht dann von einem "Gären" der Zelle (3). Die Muskelzelle vermag eine Zeitlang ohne Sauerstoff durch anaerobe Glykolyse zu überleben. Hierbei kommt es zu einer "Anhäufung" von Milchsäure; die Milchsäurekonzentration im Gewebe steigt ganz erheblich an. Dies führt zwangsläufig zu einer pH-Wert-Senkung, die durch feine pH-Meter gemessen werden kann. Die Milchsäure wird später zum größten Teil auf dem Blutwege zur Leber transportiert und dort in Glykogen umgewandelt. Ein kleiner Teil wird im Muskel in Glucose zurückverwandelt (Gluconeogenese) (4).

Charakteristisch für alle fakultativen Anaerobier ist ihre Fähigkeit, sofort zur aeroben Glykolyse zurückzukehren, wenn wieder genügend Sauerstoff angeboten wird. Dieses Phänomen bezeichnet man nach seinem Entdecker als P a s t e u r - E f f e k t (5,6).

Biochemisch gewonnene Energie, gleich ob die Pflanze sie durch Photophosphorylierung oder die tierischen Zellen sie durch anaerobe oder aerobe Stoffwechselwege gewinnen, wird stets in Form von Triphosphonucleotiden, zumeist als Adenosintriphosphat (ATP) gespeichert. ATP ist ein Phosphorsäureester des Adenosins, einer Verbindung aus der Purinbase Adenin und der Pentose Ribose (siehe Abb.1). Das C-1 der Ribose ist an das N-9 der Purinbase gebunden, die drei Phosphatreste in Kette an das C-5-ständige O der Ribose. Die im ATP gespeicherte Energie ist in der Bindung zwischen dem 2. und 3. Phosphatrest lokalisiert. Sie wird wieder frei, wenn das dritte Phosphat einfach abgespalten oder auf andere Moleküle übertragen wird; die hierbei freiwerdende Energie steht für alle möglichen biochemischen und biophysikalischen Prozesse zur Verfügung, z.B. zur Aufrechterhaltung des Wärmehaushalts, lebenswichtiger osmotischer Potentialdifferenzen (Ungleichgewichte Na^+/K^+ ; Albuminverteilung; aktiver Transport), zur Biosynthese der Zellbausteine (Eiweiße, Nucleinsäuren, Phosphatide), Entgiftungsmechanismen (Harnstoffzyklus) usw.

Die Zelle kann energiereiche Phosphate wie ATP im allgemeinen nicht von außen, etwa durch den Blutstrom beziehen. Die Bildung des energiereichen Phosphats geschieht durch Anlagerung eines anorganischen Monophosphatrestes an Adenosindiphosphat (siehe Abb.1). Dieses wirkt gleichzeitig stoffwechselregulierend: ist viel ADP vorhanden, so werden die energieliefernden Prozesse stimuliert, liegt reichlich ATP vor, so werden diese Prozesse gebremst.

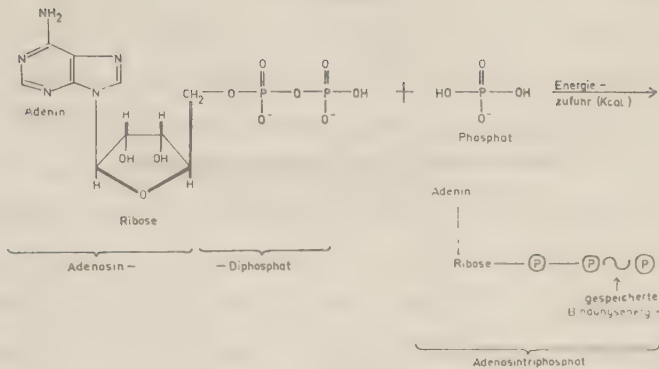


Abb.1 Bildung des Adenosintriphosphats

Der (der alkoholischen Gärung und anaerober und aerober Glykolyse gemeinsame) Weg von den Hexosen bis zur Brenztraubensäure (bzw. Milchsäure) wird als "E m b d e n - M e y e r h o f - S c h e m a" bezeichnet (siehe Abb.2). Über verschiedene Phosphorylierungsprodukte werden die C_6 -Zucker in Fructose-1,6-Diphosphat überführt und sodann in die zwei C_3 -Bruchstücke Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Dihydroxyacetonphosphat aufgespalten. In mehreren Reaktionsschritten wird das Glycerinaldehyd-3-Phosphat, das mit Dihydroxyacetonphosphat im Gleichgewicht steht, in Pyruvat (Salz der Brenztraubensäure) überführt. Durch die energieliefernde Spaltung werden auf diesem Wege zwei Mol ATP pro Mol Glucose gewonnen. Alle Reaktionsschritte werden durch spezifische Enzyme katalysiert.

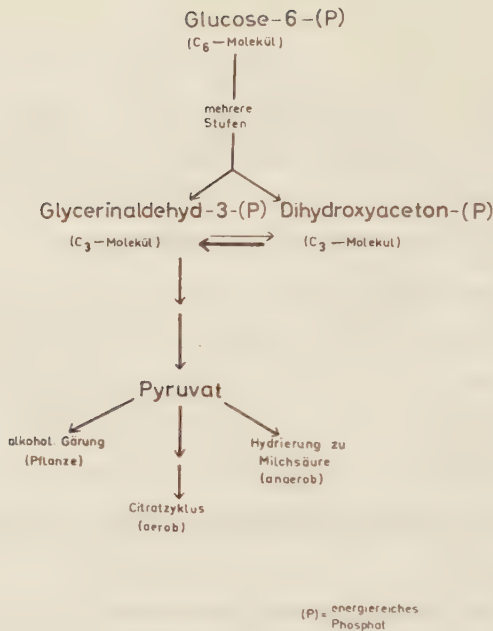


Abb.2 Vereinfachtes Embden-Meyerhof-Schema

Die Verzweigungsstelle, die alkoholische Gärung, anaerobe und aerobe Glykolyse voneinander unterscheidet, liegt beim Pyruvat bzw. seinem Phosphoenolderivat (siehe Abb.2). Im Falle der alkoholischen Gärung wird das Pyruvat decarboxyliert und über Acetaldehyd zum Alkohol reduziert. Bei der aeroben Glykolyse wird nach Decarboxylieren des Pyruvats in Acetyl-Coenzym A umgewandelt, dieses mündet in den Citronensäurezyklus ein. Bei der anaeroben Glykolyse wird der größte Teil des Pyruvats zu Milchsäure reduziert; im allgemeinen bleibt die Reaktion hier stehen.

b) Anaerobe Glykolyse und Tumorstoffwechsel

Ogleich bis heute nicht zwingend bewiesen werden konnte, daß ein prinzipieller Stoffwechselunterschied zwischen "Tumorzellen" und "Nicht-Tumorzellen" besteht, werden die Charakteristika und sogar die Ursachen des Geschwulstwachstums immer wieder in biochemischen Veränderungen der Zelle gesucht (7,8).

Der Gedanke, daß die Vielfalt pathologischer Veränderungen, wie der Morphologe sie beobachtet, auf biophysikalische und biochemische Ursachen zurückzuführen sein müsse, liegt nahe. Zahlreiche Arbeitsgruppen haben nach solchen Veränderungen zwischen neoplastischen und nichtneoplastischen Geweben gesucht (9). Es ist verständlich, daß die Ursachen eines fehlgesteuerten und unkontrollierten Zellwachstums häufig auch in einer Störung des Energiestoffwechsels vermutet wurden (10-14).

Seit langem wird die Theorie verfochten, daß der Stoffwechsel von Zellen, die in einer Geschwulst wachsen, nicht nur durch eine irreversible Atmungsschädigung gekennzeichnet ist, sondern diese irreversible Atmungsschädigung sogar Ursache für das Geschwulstwachstum sei. Prominentester Verfechter dieser Hypothese ist seit den 20er Jahren OTTO WARBURG (15), der seine Auffassungen durch sehr viele Messungen der Atmung und Gärung von Geschwulst- und Nicht-Geschwulstgeweben bestätigt glaubte (16).

Tatsächlich zeigen viele Tumorgewebe einen sogenannten negativen P a s t e u r - E f f e k t . Das besagt, daß diese Gewebe nicht nur in Abwesenheit von Sauerstoff anaerob glykolysieren ("gären"), wie dies auch etwa die Muskelzellen tun, sondern auch bei hohen Sauerstoff-Partialdrücken ihren Energiebedarf durch reine oder

partielle Anaerobiose decken. Dieser Befund wurde von vielen Autoren (17) an zahlreichen (wenn auch nicht allen), verschiedenen Untersuchungsmaterialien bestätigt gefunden. Von der Mehrheit der Arbeitsgruppen wird jedoch bestritten, daß man aus den genannten Beobachtungen den Schluß ziehen dürfte, daß der Wechsel von Aerobiose zu Anaerobiose kausalen Charakter für die Carcinogenese habe.

WARBURG schreibt (15): "Aerobe Glykolyse entsteht, wenn die Atmung wachsender Zellen gestört ist, entweder dadurch, daß das Wachstum abnimmt oder durch Störung der Abhängigkeitsverhältnisse zwischen Atmung und Glykolyse ... Die Störung der Atmung wachsender Zellen ist, vom Standpunkt der Stoffwechselphysiologie, der Grund für die Entstehung von Tumoren. Wenn die Atmung zerstört ist, stirbt die Zelle gewöhnlich. Wenn die Zelle jedoch nicht stirbt, entsteht eine Tumorzelle ..." Den vielfältigen bekannten Ursachen des Geschwulstwachstums ist nach WARBURG dies eine gemeinsam, daß sie alle eine irreversible Störung der Atmung hervorrufen. "Der irreversiblen Störung der Atmung folgt als zweite Phase der Carcinombildung ein langer Existenzkampf der gestörten Zelle um die Beibehaltung ihrer Struktur, bei dem ein Teil der Zellen wegen Energiemangels zugrunde geht, während der andere erfolgreich die verlorene Atmungsenergie aus der Glykolyse bezieht. Wegen der morphologischen Minderwertigkeit der glykolytischen Energie - es muß mehr Arbeit von der Zelle geleistet werden, da mehr Glucose für 6 Mol ATP herangeschafft werden muß als bei der Atmungsenergie - werden die hochdifferenzierten Körperzellen zu undifferenzierten, wild wachsenden Zellen verwandelt, den Krebszellen" (15). Im Zusammenhang mit WARBURGS Arbeiten sei die Tatsache erwähnt, daß auch

nicht-tumoröse Zellen durch Gewebekultur unter N_2 -Medium (16) zu anaerob glykolysierenden Zellen werden, die nach vieler Passagen sogar als Tumorzellen transplantabel sind.

Es sind sehr viele biochemische "Veränderungen" in neoplastischen Zellen gegenüber den Ausgangsgeweben beobachtet und beschrieben worden, etwa veränderte Enzymmuster (18-20), andere Konzentrationen von Metaboliten (21), Hormonen (22), Vitaminen (23) und Mineralsalz-Ionen (24). Dabei fiel auf, daß nicht-neoplastische Zelltypen mit bestimmten Enzymmustern (z.B. mit niederen Gehalten an Cytochromen) eher in neoplastische Zellen übergehen als andere (18). Man kann aber nicht einmal mit Sicherheit sagen, ob sich eine sogenannte Normalzelle (im biochemischen Sinne) wirklich in eine neoplastische Zelle "umwandelt". Eine einzelne Zelle oder eine ganze Reihe ihrer Tochterzellen oder ein ganzes Zell-Areal mögen unaufgeklärten biochemischen Veränderungen, im Sinne einer Prae-cancerose, anheim gefallen sein. Die Folge wäre, daß in einem ganzen Zell-Areal von Normalzellen plötzlich Tochterzellen leben, die schon anaerob stoffwechseln.

Eine andere Seite des Problems beleuchten die neueren Untersuchungen von AMBROSE und anderen (25,26) über Alterationen gewisser polarer und weniger polarer Phospholipoidsubstanzen der verschiedenen Zellmembranen. Auch gibt es so viele chemisch verschiedene Cancergene, daß ein Vergleich ihrer Struktur hinsichtlich der entscheidenden biochemischen Veränderungen, die sie auslösen, bis heute keinen onkologischen Ansatz geliefert hat.

Zusammenfassend kann man sagen, daß eine große Menge quantitativer

chemischer Unterschiede zwischen nicht-tumorösen und tumorösen Geweben und Zellen bekannt sind. Bei diesen Unterschieden fällt die anaerobe Glykolyse besonders auf. Doch gibt es bis heute keine sichere Möglichkeit, von Wirkungen her auf die Ursache zu schließen. Das gilt auch für die anaerobe Glykolyse.

c) Aufgabe der vorliegenden Arbeit

Ganz gleich, ob die anaerobe Glykolyse nur ein Sekundäreffekt oder Ursache, Begleitumstand oder Kernvorgang des Geschwulstwachstums ist, schien es wichtig genug zu untersuchen, ob sie auch in Hirntumoren vermehrt auftritt. Ist erst ein eindeutiger biochemischer Unterschied zwischen Geschwulstgewebe und Normalgewebe nachgewiesen, so ist ein Ausgangspunkt für tiefergehende Untersuchungen geschaffen. Ein solcher Weg könnte vom Unwesentlichen zum Wesentlichen weiterführen.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten die anaerobe Glykolyse quantitativ zu messen:

- 1.) Durch Bestimmung von Sauerstoffaufnahme und CO_2 -Abgabe von Gewebsschritten oder Homogenaten. Hierbei gibt es auch die Möglichkeit, Atmungs- und Gärungs- CO_2 zu unterscheiden. Solche Untersuchungen sind auch in einigen wenigen Fällen für Hirn und Hirntumoren durchgeführt worden (27-29). Dabei wurden deutliche Unterschiede zwischen Normalcortex und Hirntumoren beobachtet, die auf eine ausgeprägte Zunahme der anaeroben Glykolyse in Hirntumoren hindeuteten.

Der Haupteinwand gegen diese Methoden, die zumeist manometrisch durchgeführt werden, liegt in der Empfindlichkeit des Hirngewebes gegen eine kurze Unterbrechung der Blutzufuhr. Wird Hirngewebe länger als maximal 4 Minuten von der Sauerstoffversorgung abgeschnitten, so wird es im Gegensatz zu vielen anderen Geweben irreversibel geschädigt. Manometrische Messungen können aber aus technischen Gründen frühestens 20 Minuten nach Gewebsentnahme beginnen.

- 2.) Bestimmungen des pH-Wertes an lebenden Geweben zeigen im Falle einer Erniedrigung des pH nicht unbedingt die Milchsäurekonzentration an.
- 3.) Bestimmungen von Aktivitäten der Enzyme des "E m b d e n - M e y e r h o f - S c h e m a s" (z.B. histochemisch oder biochemisch) lassen ebenfalls keine sicheren Aussagen zu. Sind sie erhöht, so bedeutet dies, streng genommen, nur eine Erhöhung der glykolytischen Potenz. Die wahren Stoffwechselerhältnisse können ganz anders sein.
- 4.) Bestimmung der Aktualkonzentration von Milchsäure im Gewebe. Diese Konzentration darf als zuverlässiger Indikator des glykolytischen Umsatzes angesehen werden, wenn man bedenkt, daß Milchsäure im Gesamtchemismus der Zelle praktisch nur über die Glykolyse gebildet wird (30). Allerdings ist dieser Wert nur in erster Näherung zu bestimmen, da die Milchsäurekonzentration nach Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr sprunghaft ansteigt (31). Die über Milchsäurekonzentration im Gehirn vorliegenden Literaturwerte sind daher

mit großer Zurückhaltung zu bewerten (32). Über Milchsäurekonzentrationen in Hirntumoren gibt es unseres Wissens keine zuverlässige Untersuchung (33).

Aufgabe der hier vorliegenden Arbeit war es, durch geeignete Konservierungs- und Bestimmungsmethoden die Aktualkonzentration von Milchsäure (bzw. Lactat) in Hirntumoren und nicht-tumorösen Hirngeweben zu messen und so eine Aussage über anaerobe Glykolyse in Hirntumoren zu ermöglichen.

II. MATERIAL und METHODEN

a) Gewebe

Es wurden Gewebe von Mensch und Tier untersucht.

- 1.) Die m e n s c h l i c h e n G e w e b e wurden bei Operationen intracranieller pathologischer Prozesse gewonnen. Dabei handelte es sich um neoplastische und nicht-neoplastische Gewebe. Der Operateur entnahm jeweils einen kleinen Anteil der zu excidierenden Region - in jedem Fall v o r der Unterclippung - und ließ ihn sogleich in ein hingehaltenes DEWAR-Gefäß mit flüssigem Stickstoff fallen. (War eine Unterclippung v o r der Excision notwendig, so wurde auf das Gewebe verzichtet). Die histologische Klassifizierung der pathologisch veränderten Gewebe erfolgte im Institut für Neuropathologie der Universität Bonn.
- 2.) Als w e i t e r e B e z u g s g e w e b e wurden Organteile (Hirn, Herz und Leber) von einem Rhesus-Affen, Kaninchen und Mäusen verwandt. Affe und Kaninchen wurden durch Nackenschlag getötet. Nach rascher Eröffnung des Schädels wurde das entnommene Hirn in flüssigen Stickstoff gegeben. Vom Nackenschlag bis zur Eingabe des Gewebes in den Stickstoff vergingen im allgemeinen nicht mehr als 60 Sekunden. In zwei Fällen wurden Kaninchen in gleicher Weise narkotisiert wie die menschlichen Patienten. Alle Kaninchen wurden dem gleichen Wildstamm entnommen, wogen

2 - 2,5 kg und befanden sich in normalem Ernährungszustand. Die weißen Mäuse wogen 20 - 30 g. Sie wurden in flüssigen N_2 getaucht. Es wurde mit breitem Messer, auf das mit einem Hammer geschlagen wurde, decapitiert. Der Schädel wurde so- dann in der gleichen Weise und unter Übergießen mit flüs- sigem N_2 längs gespalten. Die beiden Hirnhälften fielen bei leichtem Klopfen in tiefgefrorenem Zustand ohne weite- res aus den Kalotten.

Gewebe, die nicht sogleich verarbeitet werden konnten, wurden in fest verschlossenen Glasdosen bei ca. $-25^{\circ}C$ in einer Tiefkühltruhe aufbewahrt.

b) Reagenzien

Flüssiger Stickstoff in guter Reinheit (rückstandsfrei) wurde aus dem Institut für Physikalische Chemie der Universität Bonn bezogen. Folgende chemische Reagenzien wurden benutzt:

Trichloressigsäure (CCl_3COOH) 99%ig

Kupfersulfat ($CuSO_4$) p.a.

Calciumhydroxyd ($Ca(OH)_2$) p.a.

Schwefelsäure (H_2SO_4) konz. p.a.

Natronlauge ($NaOH$); 1 N $NaOH$ = 0,039997 g $NaOH/ml$

0,75 M Perchlorsäure ($HClO_4$) 3,5%ig, (5 ml etwa 70%ige auf 100 ml mit H_2O verdünnt).

Diese Reagenzien wurden durch die Fa. MERCK, Darmstadt, bezogen.

Milchsäurelösung 20%ig, purum, 16% L(+), 4% D(-), Fa. ROTH, Karlsruhe.

p-Hydroxydiphenyl purum = 4-Hydroxydiphenyl, Fa. FLUKA, Buchs.

Für die Methode nach SCHOLZ wurden folgende Reagenzien benutzt:

Lösung 1 = 0,5 M Glycinpuffer, pH = 9,0; 0,4 M Hydrazin

Suspension 2 = 2 mg LDH/ml

Lösung 3 = 5 ml 0,027 M NAD (Nicotinamidadenindinucleotid)

Diese Reagenzien wurden durch die Fa. BOEHRINGER & SÖHNE, Mannheim, bezogen.

Weiterhin wurde die Biochemica-Testkombination zur Blutalkoholbestimmung benutzt. Sie enthält Alkoholdehydrogenase und Diphosphopyridinnucleotid.

Für die Versuche nach BARKER und SUMMERSON wurde einfach destilliertes Wasser verwendet, für die enzymatischen Tests bidestilliertes Wasser.

c) Bestimmung der Milchsäure nach
BARKER und SUMMERSON (34)

Bei dieser Methode wird die Milchsäure colorimetrisch bestimmt. Die Farbreaktion, deren Intensität bei 565 nm gemessen wird, kommt (in saurem Milieu) durch Umsetzung von p-Hydroxydiphenyl mit Acetaldehyd (CH_3CHO) zustande, der aus der Milchsäure ($\text{CH}_3\text{CHOH COOH}$) durch Einwirkung von konzentrierter Schwefelsäure quantitativ gebildet wird. Die Methode gestattet es, bis zu 0,01 mg Milchsäure pro ml enteweißter Lösung zu erfassen. Im allgemeinen wählt man die Konzentration so, daß sich 0,02 bis 0,1 mg Milchsäure in 1 ml

befinden. Sie ist dann auf $\pm 0,0001$ mg/ml genau.

Verfahren:

- 1.) Etwa 1 g Gewebe wird unter flüssigem N_2 zerkleinert, sodann eingewogen und mit der 10fachen Menge 10%iger, eiskalter Trichloressigsäure in einen P o t t e r - E l v e j h e m - Homogenisator (Pyrex-Glas) gespült. Es wird etwa 2 Minuten bei rd. 1500 UpM unter Eiskühlung homogenisiert. Das Homogenat wird im Verhältnis 1:5 mit aqua dest. verdünnt.
- 2.) 3 ml des Homogenats werden 10 Minuten lang bei 3000 UpM zentrifugiert.
- 3.) 1 ml des enteiweißten Überstandes wird abpipettiert und mit 1 ml 20%iger $CuSO_4$ -Lösung versetzt. Es wird mit aqua dest. auf 10 ml aufgefüllt.
- 4.) In einem gut verschließbaren E r l e n m e y e r - Kolben wird 1 g festes $Ca(OH)_2$ zugesetzt, kräftig geschüttelt und 30 Minuten stehen gelassen.
- 5.) Die Mischung wird 5 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert.
- 6.) Von dem so von störenden Substanzen (Eiweiß, Kohlenhydrate, Fette usw.) befreiten Überstand wird 1 ml entnommen und in ein verschließbares Reagensglas gegeben. 0,05 ml 4%iger $CuSO_4$ -Lösung werden zupipettiert. Aus einer Bürette läßt man 6 ml H_2SO_4 konz. zulaufen, die unter der katalytischen Wirkung von $CuSO_4$ die Milchsäure ($CH_3CHOH COOH$) in CH_3CHO umwandelt, wobei CO freigesetzt wird. Anschließend wird

die Lösung nach kräftigem Durchschütteln für 5 Minuten in ein 100°C heißes Wasserbad gestellt. Arbeitet man, wie dies normalerweise geschieht, mit Versuchsreihen, so empfiehlt es sich nach unserer Erfahrung, zur genauen Einhaltung der Reaktionszeiten jedes Reagensglas der Versuchsreihe im Abstand von einer Minute (Stoppuhr) ins Wasserbad zu stellen und nach entsprechender Zeit zu entnehmen. Zum Abkühlen werden die Reagensgläser in ein kaltes Wasserbad gestellt (Leitungswasser).

- 7.) Zur abgekühlten Lösung wird 0,1 ml einer Lösung von 1,5 g p-Hydroxydiphenyl in 0,5 %iger NaOH gegeben. Hierbei kommt es darauf an, sofort kräftig durchzuschütteln; es entstehen erfahrungsgemäß unkontrollierbare Farbintensitäten, wenn man lokale Reaktionen nicht verhindert.
- 8.) Man bringt die Proben für mindestens 30 Minuten in ein Wasserbad von 30°C. Hierbei entwickelt sich eine blaue Farbe. Dann wird nochmals 90 Sekunden lang in ein kochendes Wasserbad gestellt, die blaue Färbung schlägt ins Violette um.
- 9.) Die Farbintensität wird bei 565 nm gegen eine mitgelaufene Blindprobe (aqua dest. statt Homogenat) gemessen. In der vorliegenden Arbeit verwendeten wir ein Beckman-Spektralphotometer, Modell DU-G-4700, mit Glasküvetten von 1 cm Schichtdicke.

Für jede Versuchsreihe wurden Eichwerte aus frisch angesetzten Eichlösungen von 0,02 und 0,04 mg Milchsäure pro ml gemessen. Die Eichwerte verschiedener Versuchsreihen wichen höchstens um 0,001 mg/pro ml voneinander ab. Von 0,02 bis 0,1 mg/ml verläuft die Eichkurve linear (siehe Abb.3).

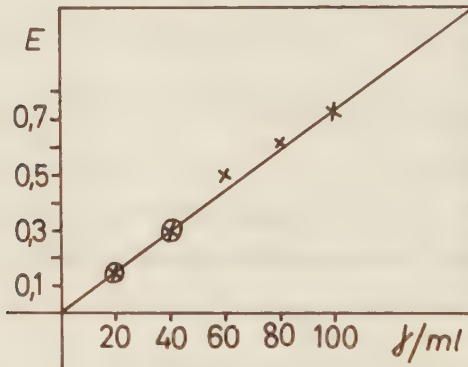


Abb. 3 Eichkurve. 0,02 - 0,1 mg Milchsäure pro ml wässrige Lösung. Die Werte von 0,02 und 0,04 mg/ml (umrandet) wurden bei jeder Versuchsreihe neu angesetzt.

d) Überprüfung der Methode nach
BARKER und SUMMERSON

Um die Zuverlässigkeit der Methode im vorliegenden Spezialfall zu überprüfen, wurden verschiedene Parameter systematisch variiert.

- 1.) Es wurde überprüft, ob eine höhere oder niedrigere Trichloressigsäurekonzentration bei Anfertigung des Homogenats Einfluß auf die Farbentwicklung haben könnte, da geringe Abweichungen des Verhältnisses von Gewebseinwaage zur Trichloressigsäuremenge nicht zu vermeiden waren. Ein solcher Einfluß kann auf Grund der Versuchsergebnisse vermutet werden (siehe Abb.4).

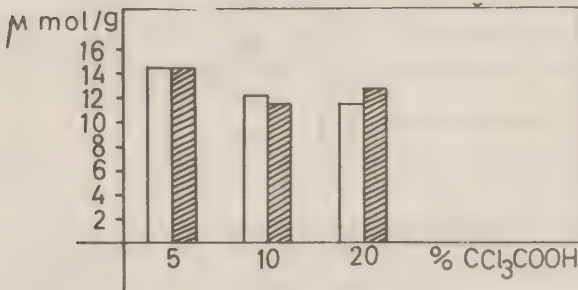


Abb. 4 Einfluß der Trichloressigsäurekonzentration auf die Farbintensität. Es wurden drei Homogenate eines Medulloblastoms mit 5%iger, 10%iger und 20%iger Trichloressigsäure angefertigt. (schraffierte Säulen: Doppelversuch)

- 2.) Was die Reproduzierbarkeit der Werte eines Homogenats selbst angeht, so wurde diese auf $\pm 0,0005$ mg/ml oder 0,2 nmol/g genau gefunden (siehe Abb.5).
- 3.) Es wurde festgestellt, daß Eichproben, die ohne $\text{CuSO}_4\text{-Ca(OH)}$ Behandlung die weiteren Arbeitsgänge durchliefen, eine erhebliche Abweichung zeigten, wenn sie gegen einen Leerwert

gemessen wurden, der mit $\text{CuSO}_4\text{-Ca(OH)}_2$ behandelt worden war. Gegen ihren eigenen Leerwert gemessen, ergaben sich keine Unterschiede zu den mit $\text{CuSO}_4\text{-Ca(OH)}_2$ angesetzten Werten (siehe Abb.6).

Proben		1.	2.	3.
normale Rindenfelder	E	0,110	0,095	0,097
	D	77%	80%	80%
Astrocytom	E	0,070	0,073	0,080
	D	85%	85%	83%
Craniopharyngeom	E	0 280	0290	0 280
	D	52%	51%	52%

Abb. 5 Reproduzierbarkeit der Milchsäurewerte in ein und demselben Homogenat. Es wurden drei Proben von einem Homogenat eines Gewebstückes untersucht. Die Unterschiede betragen maximal 3%. $E = \log \frac{I_0}{I}$; $D = \frac{I}{I_0}$.

- 4.) Es zeigte sich, daß beim Arbeitsgang nach der $\text{CuSO}_4\text{-Ca(OH)}_2$ Behandlung nicht filtriert werden darf. Es muß zentrifugiert werden. Vermutlich werden aus dem Filterpapier Kohlenhydratanteile in die Lösung mitgeschleppt, die sich bei der H_2SO_4 -Behandlung ebenfalls in Acetaldehyd umwandeln und zu hohe Werte vortäuschen.
- 5.) Es tauchte die Frage auf, ob beim Zugeben der Schwefelsäure die Reaktion mit der wässrigen Lösung so viel Wärme

erzeugt, daß Acetaldehyd entweichen kann. Die Frage kann verneint werden (siehe Abb.8).

Methode nach B+S		Leerwert	20 g/ml	40 g/ml
ohne $\text{CuSO}_4\text{-Ca(OH)}_2$	E		0,215	0,425
	D		61%	42%
mit $\text{CuSO}_4\text{-Ca(OH)}_2$	E	0,110	0,215	0,400
	D	78%	61%	40%

B+S = Barker u Summerson

$$E = \log \frac{I_0}{I} \quad E = \frac{1}{I_0}$$

Abb. 6 Einfluß der $\text{CuSO}_4\text{-Ca(OH)}_2$ -Behandlung auf die Extinktionswerte von wässrigen Milchsäurelösungen. Die Extinktion des unteren Leerwertes wurde gegen den oberen ermittelt.

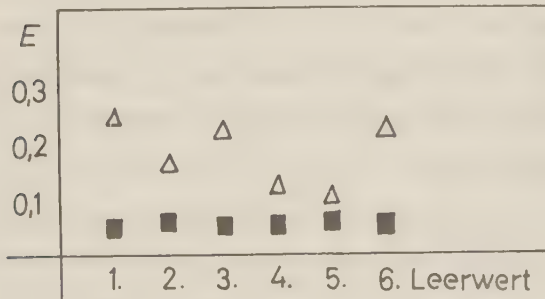


Abb. 7 Einfluß des Filtrierens und Zentrifugierens auf die Meßwerte. Jeweils sechs verschiedene Leerwerte, die entweder zentrifugiert (schwarze Kästchen) oder filtriert wurden (weiße Dreiecke). Auffallend: Die große Gleichmäßigkeit der zentrifugierten Werte.

15°C	E	0,285	0,300	0,280	0,300
	D	52%	50%	52%	50%
keine Kühlung	E	0,280	0,290	0,280	0,310
	D	52%	51%	52%	49%

Abb. 8 Einfluß der Kühlung bei Zugabe der H_2SO_4 .
Extinktion von Homogenaten (Glioblastom). Obere
Reihe: Homogenate im Wasserbad gekühlt. Untere
Reihe: Luftkühlung (Zimmertemperatur).

$$E = \log \frac{I_0}{I} ; D = \frac{I}{I_0} .$$

- 6.) Es wurde ein Versuch durchgeführt, der zeigen sollte, wie-
viel Milchsäure man wiederfindet, wenn man eine bekannte
Menge Milchsäure zu einem Homogenat zusetzt, dessen
Milchsäurekonzentration ebenfalls bekannt ist. Die zu-
gefügt Mengen wurden nahezu quantitativ wiedergefunden
(siehe Abb.9).

vorhandene Ms $\mu\text{mol/g}$	zugesezte Ms μmol	wiedergefundene Ms $\mu\text{mol/g}$	wiedergefundene Ms %
10,0	5,5	16,1	104
10,0	5,5	16,1	104
10,0	11,0	20,2	96
10,0	11,0	20,2	96
10,0	16,5	27,2	103,5
10,0	16,5	27,2	103,5

Abb. 9 Wiederauffindung von zugefügter Milchsäure in einem Tumorphomogenat (Gliom).

e) Bestimmung der Milchsäure mit
Lactatdehydrogenase
nach SCHOLZ (35)

Zur Sicherung der nach der Methode nach BARKER und SUMMERSON erhaltenen Werte wurde in einer kleineren Zahl von Fällen eine ausserordentlich spezifische Methode verwandt: die enzymatische Methode nach SCHOLZ, die in der Biochemica-Test-Kombination der Fa. Boehringer & Söhne, Mannheim, versuchsreif vorbereitet ist. Das Prinzip der Methode besteht darin, daß die Umsetzung von Lactat zu Pyruvat, die ja des Coenzyms NAD (frühere Schreibweise: DFN = Diphosphopyridinnucleotid) bedarf, gemessen wird, indem die Umsetzung des nichtreduzierten Coenzyms zu reduziertem Coenzym

spektrophotometrisch genau verfolgt werden kann. Die Menge des verbrauchten NAD^+ zum $\text{NADH} + \text{H}^+$ ist ein exakter Indikator für die Reaktion. Das Enzym LDH wird im Überschuß zugesetzt und wirkt solange, bis alle vorhandene Milchsäure umgesetzt ist.

Verfahren :

- 1.) 1 g tiefgefrorenes Gewebe wird mit 25 ml 3,5 %iger Perchlorsäure (HClO_4) übergossen und 1 Minute im T U R R A X - H o m o g e n i s a t o r (Fa. KUNKEL K.G., Staufen i.Br.) homogenisiert. Kontrollversuche ergaben, daß die hierbei freigesetzten Ionen (Fe^{++} z.B.) die LDH in keiner meßbaren Weise hemmten.
- 2.) Das Homogenat wird mit aqua bidest. (aus Glasapparatur) auf 50 ml aufgefüllt.
- 3.) Von dieser Mischung werden 3 ml entnommen und 10 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert.

4.) In Reagensgläser wird pipettiert:

	Probe:	Leerwert:
Lösung 1	2,00 ml	2,00 ml
Überstand vom Homogenat	0,10 ml	---
Perchlorsäure	---	0,10 ml
Suspension 2	0,03 ml	0,03 ml
Lösung 3 (siehe S.19)	0,20 ml	0,20 ml

- 5.) Wenn die Lösung 3 pipettiert ist, wird das Reagensglas sofort (Stoppuhr) in ein 25°C warmes Wasserbad gestellt und eine Stunde stehen gelassen. Handelt es sich um eine

Versuchsreihe, so wird Lösung 3 im Abstand von 5 Minuten in die verschiedenen Gläser pipettiert und jedes Glas nach Pipettieren der Lösung sofort ins Wasserbad gestellt.

- 6.) Nach genau einer Stunde werden die Extinktionen von Proben und Leerwert gegen Luft bei 366 nm gemessen, wobei die Extinktion des Leerwertes immer von denen der Proben abgezogen wird. Man hat natürlich darauf zu achten, daß die einzelnen Proben wieder im zeitlichen Abstand von 5 Minuten dem Wasserbad entnommen und sofort gemessen werden.

III. E R G E B N I S S E

a) Milchsäurekonzentration in Hirntumoren und Bezugsgeweben gemessen nach BARKER und SUMMERSON

Das Tumormaterial von 43 Patienten , nichttumoröses Hirn von 6 Menschen, gesundes Hirngewebe, Herz und Leber von 15 Kaninchen, 4 Mäusen und einem Rhesusaffen wurde untersucht. Es sind folgende Feststellungen zu treffen:

- 1.) Für Hirntumoren ergab sich ein Mittelwert von 12,9 nmol Milchsäure/g Feuchtgewicht. Für nicht-tumoröses menschliches Hirngewebe ergab sich 11,0 nmol, für Kaninchenhirn 8,0 ; für Mäusehirn 2,2 und für den Rhesusaffen 13,3 nmol/g Gewebe. Hinsichtlich des untersuchten Mäusehirns und Herzgewebes von Kaninchen stimmen unsere Ergebnisse mit den Werten anderer Autoren (36 - 38) überein. Für Herzgewebe ergab sich 27,7 nmol/g oder 250 mg%. Für Lebergewebe ergaben unsere Werte 11,2 nmol/g oder 100 mg% (siehe Tab. I. und II. und Abb. 10 und 11).
- 2.) Es wurde überprüft, ob die Methode wirklich alle Milchsäure anzeigt, die sich im Gewebe befindet, oder ob z.B. ein Teil, in H_2O gelöst, im Konservierungsgefäß verblieb. Zu diesem Zweck wurde der Rückstand, der in den DEWAR-Gefäßen nach Verflüchtigung des flüssigen N_2 zu finden war, auf Milchsäure untersucht. Das Ergebnis war negativ.
- 3.) Zum selben Zweck wurde der abzentrifugierte Niederschlag untersucht, der nach der Enteiweißung mit CCl_3COOH

entstanden war, nachdem er in aqua dest. gelöst und erneut zentrifugiert war. Auch dieses Ergebnis war negativ.

- 4.) Graue und weiße Substanz bei Kaninchen unterschieden sich bei einem Versuch um 0,2 nmol/g.

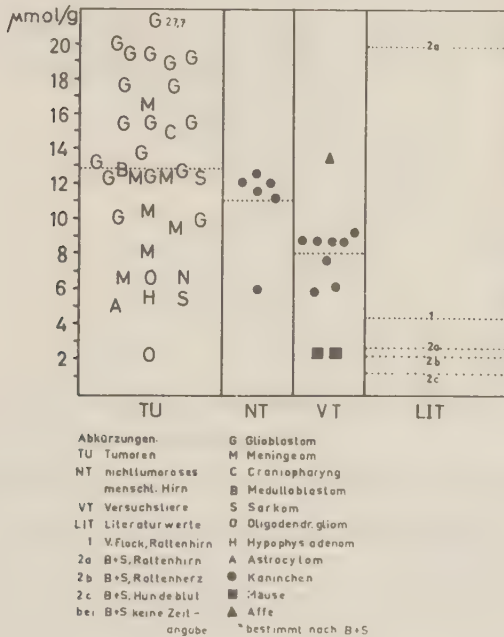


Abb. 10 Milchsäure in Hirntumoren und Bezugsgeweben. Punktierte Linien = Mittelwerte. Die Literaturwerte nach B.+ S. (BARKER und SUMMERSON) sind ohne Angabe von Entnahmezeiten und Fixationsart der Gewebe von den Autoren gegeben worden. Wie aus den Abb. 10 u. 11 hervorgeht, weichen die Standardwerte der Bezugsgewebe nur geringfügig voneinander ab.

Tab. 1. Milchsäurekonzentration in Hirntumoren und Bezugsgeweben
bestimmt nach BARKER und SUMMERSON

Tumorarten	Zahl der Fälle	Einzelwerte in nmol/g Gewebe	Mittelwert
Glioblastome	18	10,0; 10,0; 12,2; 12,5; 12,7; 13,3; 13,9; 15,6; 15,6; 15,6; 17,7; 17,7; 18,8; 19,3; 19,5; 19,5; 20,0; (27,7);	16,2
Sarkome	2	5,5; 12,2;	8,8
Medulloblastom	1	12,7;	
Astrozytom	1	5,0;	
maligne Oligodendrogliome	2	2,2; 6,6;	4,4
Hypophysenadenom	1	5,5;	
Neurinom	1	6,6;	
Craniopharyngeom	1	15,0;	
Meningeome	7	6,6; 8,2; 9,4; 10,6; 12,5; 12,5; 16,6;	10,9
Bezugsgewebe	Zahl der Fälle	Einzelwerte in nmol/g Gewebe	Mittelwert
Menschl. Rindenfelder bei eretischem Schwachsinn	1	6,0;	
Teile des Temporalpols	5	11,2; 11,6; 12,2; 12,2; 12,7;	11,0
normales Kaninchenhirn	8	5,9; 6,3; 7,7; 8,8; 8,8; 8,8; 8,8; 9,4;	8,0
Mäuse	2	2,2; 2,2;	
Affe	1	13,3	

- 5.) Um nachzuprüfen, ob unsere Homogenatkonzentrationen im richtigen Meßbereich der Methode lagen, wurden die Homogenatkonzentrationen von 1 g in 70 ml bis 1 g in 5 ml angesetzt, wobei immer darauf geachtet wurde, daß genügend Trichloressigsäure zum Enteiweißen in der Lösung war (10 ml). Es ergaben sich hyperbelförmige Kurven, deren Einzelwerte im entsprechenden Bereich lagen wie die Ausgangskonzentrationen von 1 g in 50 ml.

$$1 : 70 = 14,0 \text{ nmol/g}$$

$$1 : 50 = 11,1 \text{ "}$$

$$1 : 30 = 11,0 \text{ "}$$

$$1 : 20 = 10,2 \text{ "}$$

$$1 : 5 = \text{unmeßbar}$$

- 6.) Es war denkbar, daß Sorbitgaben bei Patienten während der Operation die Milchsäure im Hirn erhöhen könnten (Sorbit = sechs-wertiger Alkohol); daher wurde einem mit Halothan und Lachgas narkotisierten Kaninchen 10 ccm Sorbit gegeben; es fand sich gegenüber den anderen Vergleichstieren keine Erhöhung der Milchsäurekonzentration.

- 7.) Da die meisten Patienten mit Neurolept und nicht mit Halothan narkotisiert waren, wurde auch dort nach Unterschieden in der Milchsäurekonzentration gesucht, aber keine gefunden. Somit war diese Störmöglichkeit bei der Erfassung der natürlich gebildeten Milchsäure ausgeschlossen.

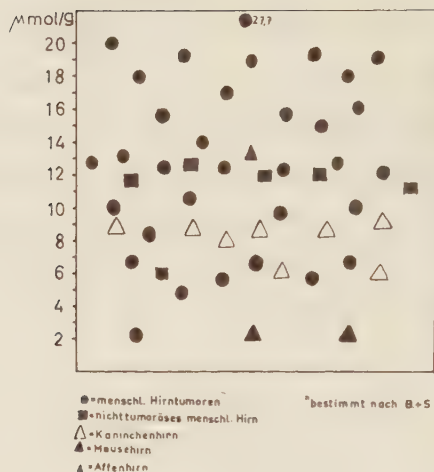


Abb. 11 Milchsäure in Hirntumoren und Bezugsgeweben (bestimmt nach BARKER und SUMMERSON).

8.) In zweifach logarithmische Beziehung gesetzt, ergeben die Milchsäurequantitäten zum Körpergewicht eine zum größeren Körpergewicht hin steigende Gerade, was den Messungen K.A.C. ELLIOTS (39,40) entsprechen würde, der bei den Säugetieren von niederem Körpergewicht größere O_2 -Aufnahme im Hirn feststellte als bei den größeren Säugetieren (siehe Abb.12). Wenn man annehmen kann, daß im normal stoffwechselnden Gewebe die Milchsäurebildung in umgekehrt proportionalem Verhältnis zur O_2 -Aufnahme steht (4,5,6), so scheinen ELLIOTS Untersuchungen die in Abb.12 dargestellten Abhängigkeiten von Körpergewicht und Milchsäurekonzentration zu bestätigen.

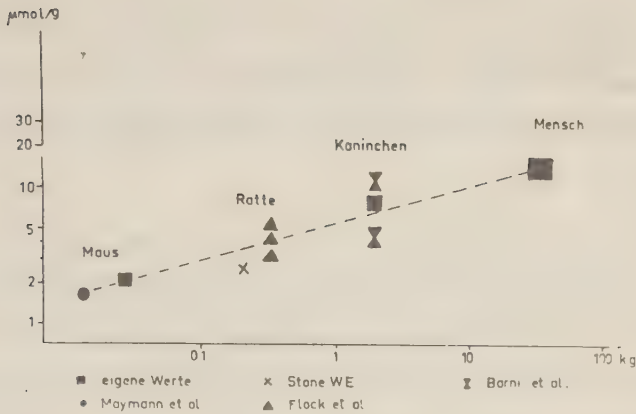


Abb. 12 Verhältnis: Körpergewicht zu Milchsäurekonzentration im Hirn (logarithmische Achseneinteilung).

b) Einfluß verschiedener Zeitfaktoren auf die Milchsäurekonzentrationen in Hirntumoren und Bezugsgeweben

Überprüft wurde, wie sich Normal- und Tumorgewebe verhalten, wenn man sie einige Zeit bei Zimmertemperatur liegen läßt. Hierbei wurden zwei verschiedene Methoden angewandt:

- 1.) Excidiertes Gewebe blieb verschieden lange Zeiträume bei Zimmertemperatur liegen und wurde sodann für die Analyse homogenisiert. Ein Teil dieses Gewebes war sofort in flüssigen N_2 gegeben und auf seine Milchsäurekonzentration analysiert worden.

2.) Gewebe, das sogleich nach der Excision in flüssigen N_2 gegeben worden war, wurde aus tiefgefrorenem Zustand aufgetaut und verschiedene Zeiträume liegengelassen, bevor es homogenisiert und auf Milchsäurekonzentration untersucht wurde.

Dabei stellte sich heraus, daß die Tumoren, die nicht mit flüssigem N_2 in Berührung kamen, schneller zu höheren Milchsäurewerten anstiegen, als die Tumoren, die aufgetaut werden mußten (vergleiche Milchsäurewerte der Tumoren in Abb.13 und 14 und in Tab. II und III).

Die Milchsäurekonzentration der nekrotischen Tumorteile fiel rasch ab, wogegen die infiltrierend wachsenden Teile steigende Konzentrationen zeigten, die allerdings nach 40 Minuten nicht mehr konstant blieben (Abb.13 und Tab.II).

Außerdem ist ein starker Anstieg der Milchsäurekonzentration bei Herz- und ein schwacher bei Lebergewebe gefunden worden (siehe Abb.14 und Tab.III).

Ein deutlicher Unterschied zwischen nicht eingefrorenem und aufgetautem Hirngewebe ist bei Kaninchen gemessen worden (siehe Abb. 15 und Tab.IV), wobei der nichteingefrorene Teil des Gewebes nach 20 Minuten ein deutliches Maximum in der Milchsäurekonzentration aufwies, die dann rasch absank. Der eingefrorene und wieder aufgetaute Teil veränderte seine Milchsäurekonzentration nicht. Die in Abb.15 dargestellten Ergebnisse sind gleichlautend mit der Feststellung von BREDOW (31), daß die Milchsäure innerhalb von Minuten um das Doppelte und Dreifache ansteigt. Dazu wurden zwei

Kaninchen mit 20 %igem Halothan, 2 ltr. Lachgas und 1 ltr. Sauerstoff in einer Zeit von 35 Minuten narkotisiert, das Hirngewebe sofort, nach 60 und 120 Sekunden entnommen und in flüssigen N₂ geworfen. Die erhaltenen Werte sind neben denen von BREDOW in Abb.15 dargestellt.

Tab. II Zeitliche Änderung der Milchsäurekonzentration in excidierten tiefgefrorenen Hirntumoren nach dem Auftauen

Glioblastome: infiltrierend wachsend							
Zeit in Minuten:	1	30	40	60	80	90	3h
Werte in							
nmol/g Gewebe	17,7;	19,7;	--	27,7;			
	16,1;	--	20,0;	--			
	15,5;	--	16,6;	17,7;			
	19,4;	--	26,6;	--	18,8;		
	20,0;	--	38,8;	30,0;	--	36,0;	32,7;
Glioblastome: nekrotisch							
Zeit in Minuten:	1	30	40	60	80	90	
Werte in							
nmol/g Gewebe	27,7;	25,0;	--	18,8;	--	--	
	15,5;	--	11,6;	--			
	10,0;	--	9,8;				

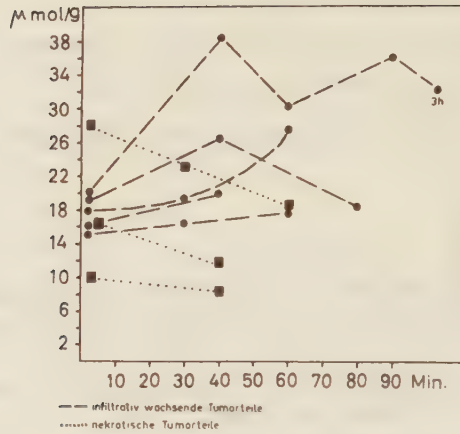


Abb. 13 Zeitliche Änderung der Milchsäurekonzentration in excidiertem, tiefgefrorenen Hirntumorgewebe nach dem Auftauen. Auffallend ist die starke Abnahme der Milchsäurekonzentration in Abhängigkeit von der Zeit bei den stark nekrotischen Tumorbezirken (siehe Tab.II).

Tab. III Zeitliche Änderung der Milchsäurekonzentration bei excidierten Geweben ohne Einfrierprozeß

Gewebsarten					
Zeit in Minuten:	1	3	25	30	40
Werte in nmol/g Gewebe					
Kaninchenherz	--	27,7	46,4		
Kaninchenleber	11,2	--	--	15,5	
Meningeom	8,3	--	--	--	12,2
Neurinom	6,5	--	--	--	15,5

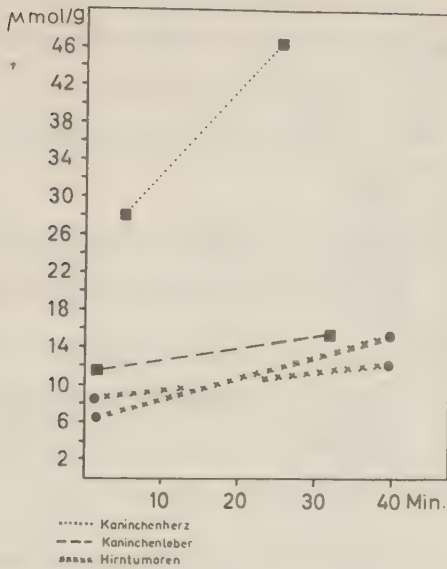


Abb. 14 Zeitliche Änderung der Milchsäurekonzentration bei excidierten Geweben ohne Einfrierprozeß. Die Gewebe wurden nach Entnahme bei Zimmertemperatur liegengelassen und nach angegebenen Zeiten (siehe Text) enteiweißt. Dabei fällt die deutlich höhere Milchsäurekonzentration auch nach 25 Minuten bei Herzgewebe auf (siehe Tab.III).

Tab. IV Zeitliche Änderung der Milchsäurekonzentration bei excidiertem Kaninchenhirn mit und ohne Einfrierprozeß

Zeit in Minuten:	1	20	40
Werte in nmol/g Gewebe			
nicht eingefroren	8,8	19,4	15,5
aufgetaut	8,8	9,8	8,7

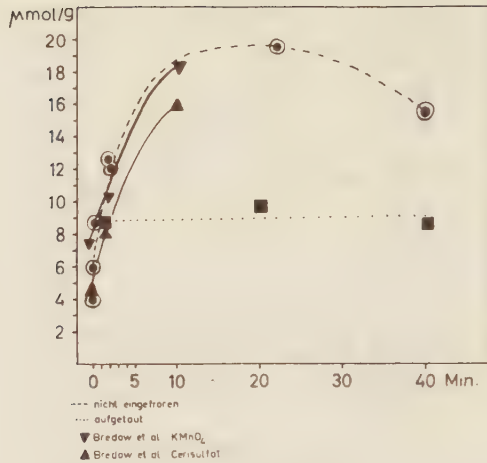


Abb. 15 Zeitliche Änderung der Milchsäurekonzentration bei excidiertem Kaninchenhirn mit und ohne Einfrierprozeß. Gestrichelte Linie mit umrandeten Punkten = Hirngewebe von narkotisiertem Kaninchen, das nach Excision bei Zimmertemperatur liegengelassen wurde. 4 und 6 nmol = Doppelbestimmung, Sofort-Wert. 8 nmol = 60 Sek.-Wert. 12 nmol = Doppelbestimmung, 120 Sek.-Wert. Dreiecke: Literaturwerte von BREDOW mit verschiedenen Methoden bestimmt. Punktiierte Linie: Aus tiefgefrorenem Zustand aufgetautes Hirngewebe. Auffallend das schnelle Ansteigen der Milchsäurekonzentration bis zu einem Maximum beim nichteingefrorenen Teil des Gewebes im Gegensatz zum Verharren auf nahezu gleichen Werten beim aufgetauten Teil des Gewebes (vergl. Tab. IV).

Da die Änderung der Milchsäurekonzentration in dieser kurzen Zeit vor sich geht, scheinen die relativ großen Schwankungen, die innerhalb der sogenannten Null-Werte der Tumoren zu verzeichnen sind

auf die verschiedenen Zeiten der Entnahme und Unterclippung der Tumoren durch die Operateure zurückführbar zu sein. Daher sind alle sogenannten Null-Werte von Tumoren in den Abbildungen mindestens als 60 Sekunden-Werte anzusehen.

c) Milchsäurekonzentrationen in Hirntumoren und
Bezugsgeweben, gemessen nach SCHOLZ

Es wurde der Milchsäuregehalt menschlicher Hirntumoren bestimmt, es ergab sich als Mittelwert 16,2 nmol/g und für die Bezugsgewebe (Kaninchenhirn) 16,5 nmol/g. Damit haben sich etwas höhere Werte als bei der Methode nach BARKER und SUMMERSON gezeigt (siehe Abb.16 u.10; Tab.V u.I).

Verschiedene Versuchsbedingungen wurden auch hier variiert, um die Ergebnisse im vorliegenden Fall abzusichern.

- 1.) Um nachzuprüfen, ob auch hier die Homogenatkonzentrationen im richtigen Meßbereich der Methode lagen, wurden die Homogenatkonzentrationen von 1 g in 50 ml (HClO_4 und $\text{H}_2\text{O} = 1:1$) bis 1 g in 5 ml angesetzt. Es ergaben sich hyperbelförmige Kurven, deren Einzelwerte im entsprechenden Bereich schwankten, wie die von 1 g in 50 ml.
- 2.) Schließlich wurden die verschiedenen Mengen Gewebe in gleicher Menge Homogenisationsmedium untersucht, und den erhöhten Homogenatkonzentrationen entsprechend erhöhte Milchsäurewerte gefunden (Abb.17).

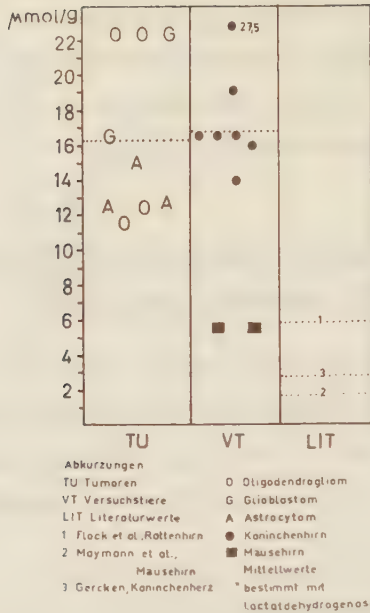


Abb. 16 Milchsäure in Hirntumoren und Bezugsgewebe. Die Mittelwerte von Tumoren und Kaninchenhirn liegen in den gleichen Bereichen. Entnahme- und Fixationszeiten der Literaturwerte decken sich mit den eigenen (36-38).

3.) Eichwerte der 1 N - und der 2 N L(+)-Milchsäurelösung, die zu 0,009 mg und 0,018 mg/0,1 ml (1:1000) verdünnt waren, wurden mit Eichwerten der 0,02- und 0,04 %igen Milchsäurelösung verglichen, die 0,016 % L(+)- und 0,04 % D(-) - Milchsäure enthält. Da sich keine sonderliche Abweichung von den Eichwerten zeigte, war anzunehmen, daß Isoenzyme der Lactatdehydrogenase auch die D(-)-Milchsäure umsetzen (siehe Abb.18).

Tab. V Milchsäurekonzentration in Hirntumoren und Bezugsgeweben bestimmt nach SCHOLZ

Tumorarten	Zahl der Fälle	Einzelwerte in nmol/g Gewebe	Mittelwert
Glioblastome	2	16,6; 22,2;	19,4;
Astrocytome	3	12,2; 12,6; 15,0;	13,2;
maligne Oligodendrogliome	4	11,2; 12,2; 22,2; 22,2;	16,9;

Bezugsgewebe	Zahl der Fälle	Einzelwerte in nmol/g Gewebe	Mittelwert
normales Kaninchenhirn	7	14,0; 16,0; 16,6; 16,6; 19,3; (27,5);	18,0;
Mäuse	2	5,5; 5,5;	

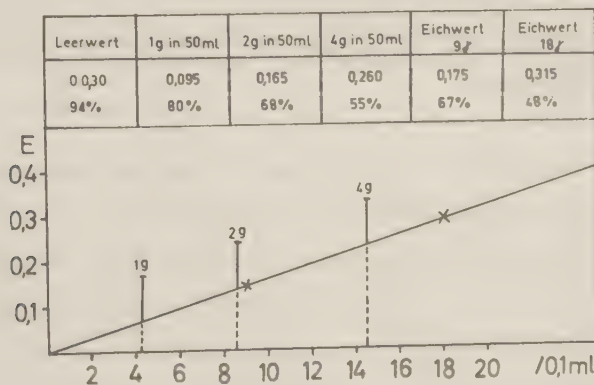


Abb. 17 Änderung der Milchsäurekonzentration mit steigender Homogenatkonzentration. Malignes Oligodendrogliom bestimmt mit LDH.

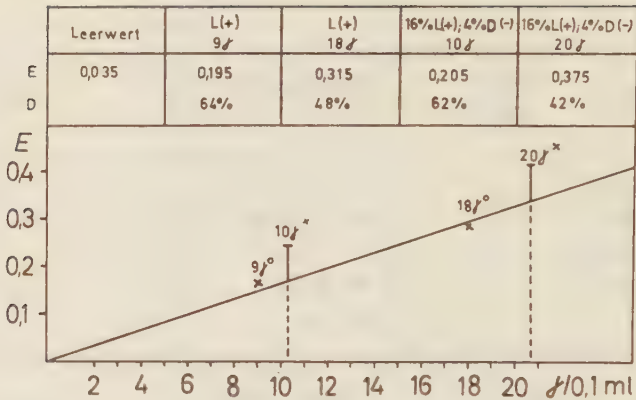


Abb. 18 Vergleich reiner L(+)-Milchsäure mit L(+)-D(-)-Milchsäuregemisch. Bestimmt mit Lactatdehydrogenase. Eichwerte waren die L(+)-Milchsäurelösungen.

- 4.) Da ein Abbau der Milchsäure zu Äthanol denkbar wäre, wurde Äthanol mit Hilfe von Alkoholdehydrogenase in zwei Hirntumoren bestimmt, aber es konnte kein Äthanol gefunden werden.

IV. D I S K U S S I O N

y

Wie aus den vorhergehenden Kapiteln zu ersehen ist, wurde die Methode nach BARKER und SUMMERSON nicht kritiklos übernommen. Insbesondere wurden die Auswirkungen von Konzentrationsänderungen der einzelnen Reagenzien und von Temperaturänderungen auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse überprüft (siehe S. 22-27). Die Methode ist sehr genau ($\pm 0,0001$ mg/ml) und es sind wenige Fehlerquellen vorhanden. Im Gegensatz zu anderen Methoden der Milchsäurebestimmung (41), die oft komplizierte Apparate erfordern und damit die Zahl der störenden Faktoren erhöhen, ist die von uns verwendete Methode als relativ sicher zu bezeichnen. Trotzdem wurden alle Ergebnisse durch Vergleichshomogenate, Doppelwerte desselben Homogenats und Blindversuche gesichert. Außerdem wurde zur Kontrolle eine ganz andere Methode gewählt: Die enzymatische Bestimmung des Lactats mit Hilfe von Lactatdehydrogenase, die noch sicherer ausschließlich das Lactat erfaßt, da die LDH substratspezifisch ist. Beide Methoden liefern keine widersprechenden Aussagen.

Die eigene Methode der Gewebekonservierung vom Operationssaal ab war zeitlich nicht weiter abzukürzen. Nach Freilegung des Tumors wurde das Gewebe mit Faßzange, Pinzette oder scharfem Löffel in ein DEWAR-Gefäß mit flüssigem N_2 geworfen. Wenn sich die Lactatwerte gegenüber der in-vivo-Konzentration geändert haben sollten, so müßte dies innerhalb von maximal 30 - 120 Sekunden geschehen sein. Wie man aus den Untersuchungen von BREDOW (31) entnehmen kann, führt von den hier vorliegenden Milchsäurekonzentrationen

ein Weg durch Extrapolation zu den wirklichen in-vivo-Konzentrationen.

Mit einer Frierstoppzange wäre zwar eine bei weitem schnellere Abkühlung des Gewebes möglich gewesen, da hier nach HOHORST et al. (43) in der Zeit von 0,15 Sekunden eine Abkühlung von $+38^{\circ}\text{C}$ auf -40°C erfolgen würde. Wir sahen von der Verwendung einer Frierstoppzange ab, weil die metabolischen Folgen im angrenzenden Gewebe beim Eingreifen mit einer solchen Zange in den Tumor nicht abzusehen sind, ferner weil die Gewebsquantitäten (1,6 g), die mit einem Mal erfaßbar sind, zu klein für hinreichende Untersuchungen nach der Methode von BARKER und SUMMERSON wären, und schließlich weil die verschiedenen Gewebsanteile der Tumoren (infiltrierend wachsend, nekrotisch, gallertig) nicht mehr zu unterscheiden gewesen wären.

Mit dem Problem des raschen Ansteigens der Milchsäurekonzentration nach Unterbrechung der Blutzufuhr sieht sich aber auch jeder andere Untersucher konfrontiert. Die in der Literatur aufzufindenden Konzentrationsangaben dürften kaum in kürzerer Zeit und unter günstigeren Umständen gewonnen worden sein. Eine Arbeit von McILWAIN (42) scheint diese Annahme zu bestätigen. Der genannte Autor bestimmte Milchsäure in Hirntumoren und Normalhirn von Menschen, war aber gezwungen, vom Operationssaal bis zu seinem Labor die Gewebsstücke in eiswassergekühlten Kunststoffbehältern zu transportieren, sie für die Warburg-Methode zu zerkleinern und in die Reaktionsgefäße einzubringen. Die relativ lange Zeitdauer bis zur völligen Durchkühlung der Gewebsstücke

das Abwiegen und Zerkleinern machen ein Ansteigen der Milchsäurekonzentration viel wahrscheinlicher als beim sofortigen Enteiweisen des Gewebes, das, wie bei unserer Methode, zuvor durch flüssigen Stickstoff auf -196°C abgekühlt war. In der Tat beschreibt McILWAIN "excessive Produktion von Milchsäure, wie sie von WARBURG auch in anderen Neoplasmen gefunden wurde". Die von anderen Autoren (32) nach Autopsie oft viele Stunden nach dem Tod der Versuchstiere gemessenen Werte müssen aus unseren Betrachtungen als völlig unzulänglich ausgeschlossen bleiben.

Der ursprüngliche Sinn der vorliegenden Arbeit war - im Zusammenhang mit den Hypothesen von WARBURG über die Cancerogenese -, nachzuprüfen, ob Milchsäure in Hirntumoren gegenüber normalen Geweben erhöht ist oder nicht. Zu erwarten war nach den bisher erwähnten Literaturangaben (9 - 16), (27 - 29) eine starke Erhöhung der Lactatkonzentration in Neoplasmen, sodaß eigentlich nur die Kette der Beweise geschlossen werden sollte, "daß auch die Zellen der Hirntumoren einen Gärungsstoffwechsel wie die Zellen anderer Neoplasmen im Sinne der WARBURG'schen Definition angenommen haben" (29). Unsere vorliegenden Ergebnisse scheinen mit dieser Annahme nicht übereinzustimmen. Die geringe Erhöhung der Milchsäurekonzentration in den Mittelwerten für Tumoren gegenüber den Vergleichsgeweben ($+1,9 \text{ nmol/g}$ mit der colorimetrischen Methode; $+0,3 \text{ nmol/g}$ mit LDH) erlauben nicht, von einer signifikanten Erhöhung zu sprechen. Sie veranlassen eher dazu, innerhalb der obengenannten Größenordnungen nahezu gleiche Substratkonzentrationen anzunehmen.

Die Schwankungen, die bei den Tumorwerten zu finden sind, können einerseits auf der Verschiedenartigkeit der gerade verarbeiteten Tumorareale beruhen, andererseits auf den unterschiedlichen Zeiten von der Entnahme des Gewebes bis zur Durchkühlung. Letzteres wird verständlich, wenn man bedenkt, daß innerhalb von 60 Sekunden schon die Milchsäurekonzentration auf das Doppelte anstieg (siehe Abb.15). Aus diesem Grunde sind auch die sogenannten Null-Werte als 60-Sekunden-Werte zu verstehen, da diese Zeit von der Entnahme bis zur Durchkühlung für alle Gewebe annähernd gilt. Alle anderen Faktoren, die zu einer höheren Lactatkonzentration im Gewebe führen könnten, dürften an Bedeutung hinter dem schnellen Milchsäureanstieg nach Unterbrechung der Blutzufuhr zurückstehen. Die Tatsache, daß die Methode mit LDH im ganzen höhere Milchsäurekonzentrationen anzeigte als die colorimetrische Methode kann vielleicht darauf beruhen, daß alle Gewebeproben der letzteren Methode mit dem P o t t e r - E l v e j h e m - H o m o g e n i s a t o r (6000 UpM) zerkleinert wurden, und die der ersteren mit dem T u r r a x - H o m o g e n i s a t o r (20 000 UpM), der das Gewebe besser zu zerschlagen scheint (S.20 u.28).

Manche Autoren (9), die um acht- bis zehnfach erhöhte Milchsäurekonzentrationen in verschiedenen Organtumoren von Ratten (nicht Hirntumoren) fanden, haben zunächst normales Rattenhirn und Organ- gewebe von Ratten zu menschlichen Neoplasmen in Beziehung gesetzt. Das ist nicht ganz unproblematisch, da der Milchsäuregehalt (siehe Abb.12) ebenso wie die O_2 -Aufnahme (39) mit wachsendem Körpergewicht zu steigen scheinen, und bei verschiedener Spezies andere

Substratkonzentrationen wahrscheinlich sind. Daher wurde auch in der vorliegenden Arbeit dem Kaninchenhirn (größeres Körpergewicht der Tiere) als Bezugsgewebe der Vorrang vor Ratten- und Mäusehirn gegeben. Die Versuchstiere, bei denen manche Autoren (9,44) die Milchsäurekonzentration im Hirn maßen, wurden lebend mit dem Kopf in flüssige Luft eingetaucht und so getötet. Sodann wurde der Tierschädel eröffnet, das Hirn entnommen und auf Milchsäurekonzentration untersucht (u.a. nach FRIEDEMANN, COTONIO und SHAFFER (44) - einer manometrischen Methode, die im Hinblick auf die O_2 -Empfindlichkeit der Nervenzelle unsicher ist - und ähnlichen Methoden (41)). An dieser Stelle ist zu überlegen, daß es in jedem Falle darum geht, einen Gewebeblock bis ins Innere hinein sofort so tief zu kühlen, daß potentielle Milchsäurevorstufen keine zusätzliche Milchsäure mehr liefern können, und die entsprechenden Enzyme längst inaktiviert sind. Nun darf man aber annehmen, daß ein Gewebeblock wie ein ganzes Hirn, das bei Eintauchen des Tierkopfes in die flüssige Luft noch gänzlich von Schädelknochen umschlossen ist, keinesfalls bis ins Innere die notwendige Unterkühlung erfährt, wie das von uns frei von Knochen in kleinen Anteilen (1-3 g) eingeworfene Gewebe (Ausnahme: Mäuse). Es muß erwähnt werden, daß z.B. LE PAGE (9) auch bei chemisch induzierten Carcinomen von Mäusen und Ratten dreimal höhere Werte fand als bei normalen Vergleichsgeweben. Es ist aber nicht sicher, daß diese Tumoren bei Mäusen und Ratten den gleichen Stoffwechsel haben müssen wie Spontantumoren.

Als bekannte Tatsache scheint zu gelten, daß die Lactatkonzentration im Gehirn bei Narkose stark erniedrigt wird (36,45). Diese

Feststellung konnte bei einem Kontrollversuch an zwei Kaninchen nicht bestätigt werden (siehe S.37). Dabei ist zu berücksichtigen, daß die zitierten Autoren Nembutalnarkose anwandten, bei der durch Überdosierung leicht Hirnschädigungen eintreten können. Welche Stoffwechselveränderungen dann im Hirn wirksam werden, ist unsicher. Bei den vorliegenden Untersuchungen (siehe S.37) wurde Halothan benutzt, wie es die Patienten erhalten, in adaequaten Mengen dosiert, auf ruhige Atmung des Tieres geachtet, und es ist nicht anzunehmen, daß nach Erscheinen der gleichen Milchsäurekonzentration wie bei den unnarkotisierten Kaninchen, diese Narkose auf die Milchsäureproduktion ausschlaggebenden Einfluß ausgeübt hat (siehe Abb.15). Solche Ergebnisse könnten in Zusammenhang mit den Versuchen LÖWENSTEINS gebracht werden, der keine Veränderungen der Lactatkonzentration im Blut halothannarkotisierter Menschen gegenüber nicht narkotisierten fand (46).

Die Milchsäurekonzentration der eigenen Bezugsgewebe (Kaninchenhirn) deckt sich mit vielen, wenn auch nicht allen Werten der genannten Arbeitsgruppen. Die Werte für normales Kaninchenhirn liegen bei uns um das Zweifache höher als die einer Arbeitsgruppe (32), die auch nach der Methode von BARKER und SUMMERSON gearbeitet hatte, aber die Extinktion bei 520 nm maß, was einen deutlichen Unterschied zur vorgeschriebenen Wellenlänge von 565 nm bedeutet. Die Tatsache, daß sich bei den eigenen Messungen höhere Milchsäurekonzentrationen ergaben als bei den genannten Autoren (32), könnte auch darin begründet sein, daß durch den Nackenschlag mit einer Eisenstange, durch den die Kaninchen betäubt wurden, sich die Halswirbel so verschoben haben, daß die arteria vertebralis

vollkommen abgeklemmt wurde. Da sie den größten Teil des Hinterhauptes mit Blut versorgt, und somit dieser Teil des Hirns bis zur Eingabe in flüssigen N_2 von der Blutzufuhr abgeschnitten war, konnte die Milchsäure durch den akuten O_2 -Mangel ansteigen. Ob diese Zeit ausreicht, den Milchsäurespiegel um 100 % zu erhöhen, zumal es sich bei der von der arteria vertebralis versorgten Region nur um einen kleinen Teil des Gesamthirns handelt, ist eine unsichere Fragestellung, die nicht ohne weiteres als Gegenargument gelten kann. Es wurden aber in Narkose und unter sofortiger Eingabe des Kaninchenhirns in flüssigen N_2 ebenfalls die Werte von BREDOW (31), BARNI (32), MAYMAN (36) und THORN (47) erreicht (siehe Abb.15).

Um ein ungefähres Bild über die Veränderungen der Milchsäurekonzentration im Hirngewebe nach Entfernung aus Blutzufuhr und Gewebeszusammenhang zu bekommen, wurden normale Gewebe und Tumoren bei Zimmertemperatur liegengelassen, ohne daß sie mit flüssigem N_2 in Berührung kamen, und andere Tumoren und Normalgewebe, die in der Tiefkühltruhe gelegen hatten, wurden während der gleichen Zeit aufgetaut. Eindeutig scheint das Ergebnis bei Kaninchenhirn zu sein, das nicht mit N_2 in Berührung kam: Die Fermentaktivität scheint bei allen Werten gleichmäßig bis zu 20 Minuten erhalten zu sein, sodaß die Milchsäurewerte steigen. Sodann fallen sie rasch ab. Parallelversuche mit Kaninchenhirn, das aufgetaut werden mußte, zeigen praktisch keinen Anstieg der Milchsäure (Abb.15). Wahrscheinlich besitzen die Fermente nach dem Auftauen keine grose Aktivität mehr, möglicherweise weil sie durch Kälte und/oder Alterung denaturiert wurden; Faktoren, die Einfluß auf die Funk-

tionsstruktur der Fermenteiweiße haben können. Tumoren dagegen zeigten gleichmäßig langsam steigende Milchsäurekonzentrationen in einer Zeit von 40 Minuten. Das könnte daraufhinweisen, daß die LDH zwar weniger wirksam in ihnen ist, dafür aber weniger schnell inaktiviert wird und stabiler zu sein scheint. Auf ähnliche Ergebnisse verweist WOLFF (48). Außerdem ist bekannt, daß z.B. schon innerhalb verschiedener Organe in einem Organismus die Denaturierungsempfindlichkeit der Fermente sehr verschieden ist (LDH in Herz und Leber)(49).

Die Milchsäurekonzentration in Tumoren, die aufgetaut wurden, scheint ebenfalls bis 40 Minuten zu steigen (siehe Abb.13). Über die späteren Messungen sind keine eindeutigen Aussagen möglich, da weiteres Liegenlassen der aufgetauten Gewebe über 40 Minuten hinaus keine zuverlässigen Veränderungen mehr ergab.

Was die Untersuchungen nekrotischer Gewebsstücke angeht, so scheint in diesen Teilen des Gewebes allgemeiner Zerfallsstoffwechsel zu herrschen; darauf deuten die eigenen Untersuchungen hin, die bei nekrotischen, zu Zimmertemperatur aufgetauten Tumorteilen 40 und 60 Minuten später sogar einen deutlichen Abfall der Milchsäurekonzentration ergaben (siehe Abb.13). In der Literatur fanden sich keine Angaben über Milchsäurekonzentrationen in nekrotischen Tumorgeweben.

Übereinstimmend mit Ergebnissen von GEERKEN (37) scheint die Milchsäurebildung im Kaninchenherz nach Unterbrechung der Blutzufuhr schnell zuzunehmen. Wie aus den Anfangskonzentrationen hervorgeht, scheint das Herzgewebe in Bezug auf Bildung von Milchsäure überhaupt

stoffwechselaktiver zu sein als das Hirn (siehe Abb.14 u.Tab.III).

Ein seltsamer Befund ist, daß sich graue und weiße Substanz, die bei narkotisiertem Kaninchen sauber getrennt wurden und ebenso schnell wie die anderen Gewebeproben in flüssigen N_2 gekommen waren, kaum in der Milchsäurekonzentration voneinander unterschieden.

Wie ist nun die eigentliche Hauptbeobachtung zu interpretieren, daß die Milchsäurekonzentration in Hirntumoren um annähernd die gleichen Mittelwerte schwankt wie bei den vergleichbaren Bezugsgeweben?

Zunächst soll die Frage nach der Aussagekraft einer solchen Konzentrationsangabe diskutiert werden.

Die große Verzweigtheit und Kommunikation des Apparates biochemischer Zellfunktionen erschwert die Deutung eines sicher erhobenen Einzelbefundes. Die sehr komplizierten Auswirkungen der verschiedenen Regulationsmechanismen sind quantitativ bisher nur schwer zugänglich. Eine andere Schwierigkeit stellen die makroskopischen und mikroskopischen Veränderungen innerhalb des Tumors dar: Bionekrosen, kleine Schleimzysten, Hämorrhagien, Zonen verschieden starker Proliferationstendenz, Reaktionsphasen zwischen neoplastischem gliösem und nicht-neoplastischem gliösem Material. Solchen Problemen sieht sich gegenüber, wer die Konzentration irgendeines Substrates in einem Gemisch verschieden metabolisierender Zellen, die zusammen homogenisiert wurden, zu interpretieren hat. Da aber methodische Möglichkeiten der Trennung zur Zeit nicht gegeben waren, bleibt es ein Notbehelf, diese Substrate zu bestimmen, und unter gleichen Bedingungen gewonnene Ergebnisse von gesundem und

krankem Gewebe zu vergleichen.

Zur Interpretation von WARBURGS Hypothese der Cancerogenese ist folgendes zu sagen: Es wurde von der immer wieder bestätigt gefundenen glykolytischen Kapazität der Tumorzelle gesprochen, mit der sie angeblich ihren hohen Energiebedarf decken soll, nachdem das viel rationeller arbeitende Atmungssystem der oxydativen Phosphorylierung nicht mehr leistungsfähig ist. RAPOPORT hat in seinem Lehrbuch über die "Medizinische Biochemie" eine treffende Darstellung der herrschenden Meinung über die Biochemie der bösartigen Geschwülste gegeben, wenn er sagt: "Eine Vielzahl von Untersuchungen, die von den verschiedensten Gesichtspunkten aus durchgeführt wurden, haben einen wahren Berg an Tatsachen zusammengetragen, ohne daß jedoch wesentliche Fortschritte über die Erkenntnisse hinaus erzielt werden konnten, die WARBURG schon in seinen ersten Untersuchungen gewonnen hatte" (50).

Es wäre vielleicht zu erwarten gewesen, daß man nun eine weiterführende Erkenntnis über die typischen Wesensarten der tumorösen Zelle erlangt hätte, oder, daß man die Genese der tumorösen Veränderung erhellt hatte, wenn WARBURGS Behauptung, die irreversible Atmungsschädigung führe zu Neoplasmen, als Charakteristikum des Tumorstoffwechsels aufzufassen wäre.

Hier ist die Frage unvermeidlich, ob die Atmungsschädigung als Begleiteigenschaft oder als ursächlicher Faktor der Tumorzelle zu verstehen ist. NORDMANN (51) sieht die erhöhte Glykolyse nicht einmal als Spezifikum der Tumorzelle an. Wenn es sich bei der glykolytischen Kapazität der Tumorzellen, die den Sauerstoff nur

noch in geringem Maße verwendet, nur um ein Charakteristikum handelt, ist es dann ein Charakteristikum primärer, sekundärer oder tertiärer Natur? Diese Frage ist genauso ungeklärt wie die Frage, ob die Atmungsschädigung Ursache des Tumorwachstums ist. Einerseits ist nachgewiesen worden, daß sogenannte normale Zellen in der Gewebekultur bei mangelndem O_2 -Druck in irreversibel glykolysierende Zellen übergingen, vielleicht von Zellgeneration zu Zellgeneration mehr (16). Schließlich konnte man diese Zellen sogar lebenden Organismen implantieren und erhielt Impftumoren, die kräftig wucherten. Andererseits führen O_2 -Mangelercheinungen in vivo zu allen möglichen Befunden pathologischer Art, aber **n i c h t m i t S i c h e r h e i t** zu neoplastischem Wachstum.

Eine Erhöhung der Milchsäurekonzentration, die dann als Indikator eines erhöhten glykolytischen Umsatzes zu verstehen ist (siehe S.15), soll gleichzeitig eine mögliche Schädigung der Zellatmung anzeigen, da die Zelle nur anaerob glykolysiert und vermehrt Milchsäure produziert, wenn kein Sauerstoff vorhanden ist (arbeitende Muskelzelle), oder die Zelle ihn nicht verwertet, wie es bei den Tumorzellen der Fall ist. Da die vorliegenden Ergebnisse offensichtlich nicht für erhöhte Milchsäurekonzentrationen in Hirntumoren sprechen, so bleiben nur einige, sich widersprechende Deutungsmöglichkeiten für die hier gefundenen nahezu gleichen Konzentrationen in Hirntumoren und gesundem Hirn.

- 1.) Es wäre denkbar, daß excidierte Tumorareale **i n v i t r o** den Sauerstoff gegenüber Bezugsgewebe nicht oder nur in geringem Maße nutzen, was ein Grund für die mangelnde Atmung von Tumorschnitten bei **WARBURGS** Versuchen sein könnte.

2.) In den Hirntumorgeweben wird Milchsäure vielleicht deshalb nicht erhöht gefunden, weil

- a) die Tumorareale glykolysieren, die Milchsäure aber auf dem Stoffwechselwege (per Blut, Liquor) verschwindet. Die Beobachtungen von CORI (12) und BIERICH (11) würden für diese These sprechen (sie fanden mehr Milchsäure im Blut der abführenden Gefäße des Tumors als in den zuführenden);
- b) in Tumoren die Möglichkeit der sofortigen Resynthese der Glucose aus Milchsäure (Gluconeogenese, Glykogenbildung) besteht, und sich dadurch das Verschwinden der Milchsäure erklärt;
- c) die schlechte O_2 -Nutzung der Tumorareale andere Gründe als die der anaeroben Glykolyse hat, die ja an Stelle der Atmung getreten sein soll.

Der Widerspruch bleibt zunächst unaufgelöst. Daß die Zelle einerseits nicht atmen soll (weil sie den Sauerstoff nicht zur Energiegewinnung über die oxydative Phosphorylierung verwertet), andererseits aber nicht mehr Milchsäure bildet als im normal atmenden Gewebe (in dem nur dann Milchsäure in größeren Mengen gebildet wird, wenn die Energiegewinnung vornehmlich über die anaerobe Glykolyse vor sich geht), ist zunächst schwer verständlich. Ein solches Paradoxon sollte aber zu weiteren Überlegungen und Untersuchungen anregen.

V. Z U S A M M E N F A S S U N G

In 43 Gewebeproben von menschlichen Hirntumoren und 26 nicht-tumoralen Hirngeweben von Mensch, Affe, Kaninchen und Maus, sowie in Herz- und Lebergewebe von Kaninchen wurde die Milchsäurekonzentration durch die colorimetrische Methode nach BARKER und SUMMERSON (34) und mit Hilfe von Lactatdehydrogenase (UV-Test, BOEHRINGER) bestimmt. Die Gewebe wurden sogleich nach Unterbrechung der Blutzufuhr in flüssigen N_2 geworfen und ohne Auftauprozess zu den entsprechenden Homogenaten verarbeitet, sodaß die gefundenen Werte den in-vivo-Konzentrationen sehr nahe kommen dürften. Auffallendster Befund war, daß sich die Milchsäurewerte für menschliche Hirntumoren, bei breiter Streuung, statistisch nur wenig von denen nicht-tumoralen Hirngewebe unterschieden. Es wurde bestätigt gefunden, daß die Milchsäurekonzentration im Hirn und anderen Geweben nach Unterbrechung der Blutzufuhr zunächst sprunghaft ansteigt. Das gilt auch für Tumoren. Es wurde weiterhin festgestellt, daß die Milchsäurekonzentration mit fortschreitender Nekrotisierung der Tumoren sinkt. In tumorösen Randgebieten steigt die Milchsäurekonzentration auch, nur langsamer und länger andauernd. Ferner wurde eine Abhängigkeit zwischen Milchsäurekonzentration in nicht-tumoralen Hirngeweben und Körpergewicht gefunden.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1.) Karlson, P. Kurzes Lehrbuch der Biochemie.
Thieme, Stuttgart, 1966, S.244.
- 2.) Rapoport, S.M. Medizinische Biochemie. VEB-Verlag
Volk u.Gesundheit, Berlin, 1965, S.338.
- 3.) *ibid.* S.662.
- 4.) *ibid.* S.403.
- 5.) *ibid.* S.407.
- 6.) Dannenberg, H. Biochemie der Tumoren.
Springer, Berlin, 1959, S.406.
- 7.) *ibid.* S. 392 - 459.
- 8.) Hoppe-Seyler Handbuch der physiologisch- und patho-
Thierfelder logisch-chemischen Analyse. 10.Aufl.,
Bd.V, Springer, Berlin, 1953, S.694.
Ref.: Dittmar, C. Z.Krebsforsch. 52,
46 (1941).
- 9.) Aisenberg, A.C. The Glycolysis and Respiration of Tumors.
Harvard, Medical School, Academic Press,
New York, London, 1961.
Ref.: Le Page, G.A. Cancer Research 8,
193, 197 (1948).
- Le Page, G.A. Glycolysis in Tumor Homogenates.
J.Biol.Chem. 176, 1009 (1948).
- Le Page G.A. Biological Energy Transformations During
Shock as Shown by Tissue Analysis.
Am.J.Physiol. 146, 267 (1946).
- 10.) Bierich, R. Untersuchungen über das Zustandekommen
der bösartigen Geschwülste.
Hoppe-Seyler's Zschr. 155, 244-248 (1926)

- 11.) Bierich, R. u.
A. Rosenbohm
Über den Milchsäuregehalt von normalem
und von Krebsgeweben.
Hoppe-Seyler's Zschr. 214, 271 (1933).
- 12.) Cori, C.F. and
G.T. Cori
The Carbohydrate Metabolism of Tumors.
J.Biol.Chem.Baltimore, 65, 397-405 (1925).
- 13.) Kit, S. and
A.C. Griffin
Aerobic Glycolysis in Tumors.
Cancer Research, 18, 621 (1951).
- 14.) Wuest, H.
Serum-Isoenzyme der LDH bei Patienten
mit malignen Tumoren.
Verhandl.Deutsch.Ges.Inn.Med. 71, 949
(1965).
- 15.) Warburg, O.
Über den Stoffwechsel der Tumoren.
Springer, Berlin, 1926.
- 16.) Warburg, O.,
K. Gawehn,
A.W. Geissler,
W. Schröder,
H.S. Gewitz und
W. Völker
Partielle Anaerobiose der Krebszellen
und Wirkung der Röntgenstrahlen auf
Krebszellen.
Verhandl.d.Gesellschaft deutscher Natur-
forscher und Ärzte, Springer, Berlin
(1959).
- 17.) Elliot, K.A.C.
und M.E. Greig
The Metabolism of Lactid Acid and
Pyruvic Acids in Normal and Tumor
Tissues.
Biochem.J.London, 31, 1021-1032 (1937).
- 18.) Allan, N.
Cytochrome-Oxidase in Human Brain-Tumors.
J.Neurochem. 2, 37-44 (1957).
- 19.) Burk, D.
Über die Begründung einer Chemotherapie
des Krebses auf der Grundlage einer
primären Hemmung der Glucosephosphory-
lierung (Hexokinase-reaktion) durch
Beeinflussung von Substrat, Coenzym
und Enzym.
Klin.Wschr. 35, 1102-1105 (1957).

- 20.) Greenstein, J.P. The Biochemistry of the Malignant
 Tissues.
 Ann.Rev.Biochem. 14, 643-664 (1945).
- Greenstein, J.P. Biochemistry of Cancer. Academic.Press
 Inc., 2.Aufl.1954, New York 1947.
- 21.) Dohr, H. und Mengenunterschiede in den Mitochondrien-
 M.P. Herranz enfraktionen von Hirntumoren und norma-
 lem Hirngewebe.
 Klin.Wschr. 42, 244-245 (1964).
 Ref.: Novikoff, A.B. Cancer Research
 17, 1010-1027 (1957).
- 22.) Hoppe-Seyler Handbuch der physiologisch- und patho-
 Thierfelder logisch-chemischen Analyse. 10.Aufl.,
 Bd.III/2, Springer, Berlin, 1956, S.1520.
 Ref.: Wettstein, A. und G. Aimer, Exper.
 10, 397 (1954).
- 23.) Burk, D. und The Biochemistry of Malignant Tissue.
 R.J. Winzler Ann.Rev.Biochem. 13, 487-532 (1944).
- 24.) Dannenberg, H. Biochemie der Tumoren.
 Springer, Berlin, 1959, S.397-401.
- 25.) Ambrose, E.J. Surface Characteristics of Neoplastic
 Cells. Henry Ford Hospital Internatio-
 nal Symposium: Biological Interactions
 in Normal and Neoplastic Growth.
 London: Churchill 1962.
- 26.) Dohr, H. , Phospholipide in Hirntumoren. Ver-
 A. Manteca und gleichende Untersuchung in tumorfreien
 E. Scheithauer Hirngeweben.
 Acta Neurochirurgica Vol.XVII, Fasc.
 1-2 (1967).

- 27.) Weber, G. Atmung und aerobe Glykolyse von menschlichen Hirntumoren und darüberliegendem Cortex in vitro.
Acta Neurochir., Wien, Suppl.VI, 211-218 (1959).
- 28.) Heller, J.H. and The Metabolism of Normal Brain and Human
K.A.C. Elliot Gliomas in Relation to Celltype and Density.
Canad.J.Biochem.Physiol. 33, 395-403 (1955).
- 29.) Dohr, H. Über die Atmung von menschlichen Hirntumoren und Hirngewebe in vitro.
Acta Neurochir., Vol.IX, Fasc. 4 (1961).
- 30.) Karlson, P. Kurzes Lehrbuch der Biochemie.
Thieme, Stuttgart, 1966, S.285.
- 31.) Bredow, W. und Zur Messung der anaeroben Glykolyse des
W. Thorn Kaninchenhirns in situ.
Biochem.Zschr. 321, 357-360 (1951).
- Stone, W.E. Acid Soluble Phosphorus Compounds and Lactic Acid in the Brain.
J.Biol.Chem. 135, 43 (1940).
- 32.) Barni, J., Variazioni dell'acido lattico cerebrale
F. Fabroni und dell'annegamento. Rilievi sperimentali sulla loro utilizzazione diagnostica.
P. Martini Bollettino della Societa Italiana di Biologia Sperimentale, Vol.XI, Fasc.5 (1963).
- 33.) Lehrer, G.M. The Quantitative Histochemistry of Human Glial Tumors.
Internat.Kongreß f.Neuropathologie, München, Proc.IV, Vol.I, Histochemie und Biochemie, Thieme (1962) S.66.

- 34.) Barker, S.B. and W.H. Summerson The Colorimetric Determination of Lactic Acid in Biological Material. J.Biol.Chem. 138, 535-554 (1941).
- 35.) Scholz, R., H. Schmitz, Th. Bucher und S.O. Lampen Eine enzymatische Bestimmung der L(+) Milchsäure mit Milchsäuredehydrogenase. Biochem.Zschr. 331, 71 (1959).
- 36.) Mayman, C.J., P.D. Gatfield and B. McL Breckenridge The Glucose Content of Brain in Anaesthesia. J. Neurochem. Vol.11, 483-487 (1964).
- 37.) Geerken, G. Quantitative enzymatische Dehydrierung von L(+)-Lactat für die Mikroanalyse. Hoppe-Seyler's Zschr. 320, 180 (1960).
- 38.) Flock, E.V., C.M. Tyce and C.A. Owen, jr. Utilization of (U-¹⁴C) Glucose in Brain after Total Hepatectomie in the Rat. J.Neurochem. Vol.13, 1389-1406 (1966).
- 39.) Elliot, K.A.C. Neurochemistry. The Chemical Dynamics of Brain and Nerve. Edt.by Elliot, Page, Quastel, Illinois, Springfield U.S.A. Thomos (1955) s.53.
- 40.) Gombos, G., A. Geiger and S. Otsuki The Metabolic Pattern of the Brain in Brain Perfusion Experiments in Vivo. Pyruvat and Lactate-Formation from ¹⁴C-labelled Aspartate. J.Neurochem. Vol.10, 405-413 (1963).
- 41.) Hoppe-Seyler Thierfelder Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. 10.Aufl., Bd.V, Springer, Berlin, 1953, S.103-107. Ref.: Markus, R.L., Arch.Biochem. 29, 159 (1950). Linhardt, K. u. Reichhold, E., Biochem. Zschr. 320, 241 (1949/50).

- Fuchs, H.J., Hoppe-Seyler's Zschr. 221, 271 (1933).
- Dische, Z. u. Laszlow, D., Biochem. Zschr. 187, 344 (1927).
- Lang, K. u. Pfleger, K., Mikrochem. 36/37, 1174 (1951).
- 42.) Brierley, J.B.
und H. Mc Ilwain Metabolic Properties of Cerebral Tissues
Modified by Neoplasia and by Freezing.
J.Neurochem. Vol.1, 109-118 (1956).
- 43.) Bergmeyer, H.U. Methoden der enzymatischen Analyse.
Verlag Chemie GMBH, Weinheim, 1962, S.44.
- 44.) Friedemann, T.E.,
M. Cotonio and The Determination of Lactic Acid.
P.A. Shaffer J.Biol.Chem. 73, 335 (1927).
- 45.) Richter, D. and Brain Metabolism in Emotional Excite-
R.M.C. Dawson ment and in Sleep.
Am.J.Physiol. 154, 73 (1946).
- 46.) Löwenstein, E.,
J.D. Clark and Lactate Production during Halothane
Y. Villareal Anaesthesia in Man.
J.Am.Med.Association 190 (13) , 1110-
1113 (1964).
- 47.) Thorn, W. Über die anaerobe Glykolyse des Warm-
blütergehirns in situ.
Biochem.Zschr. 321, 361-367 (1951).
- 48.) Wolff, M. Substrates of Glycolysis of Intracra-
nial Tumors during Complete Ischemia.
Cancer Research 25, 432-439 (1965).
- 49.) Rapoport, S.M. Medizinische Biochemie. VEB-Verlag
Volk u. Gesundheit, Berlin, 1965, S.78.
- 50.) *ibid.* S.771.

51.) Nordmann, R.

Changes in Energie Metabolism in
Cancerous Tissues.

Rev.France Etudes, Clin.Biol. 10 (6),
607-616 (1965).

Am Schluß dieser Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. P. RÖTTGEN für die freundliche Überlassung des Themas und Herrn Dipl.Chemiker Dr. H. DOHR für die zahlreichen, wertvollen Hinweise während der Bearbeitung dieser Abhandlung meinen herzlichen Dank aussprechen.

Lebenslauf

Am 29. März 1942 wurde ich als zweiter Sohn des Dipl. Architekten Felix Heussen und seiner Frau Katharina geb. Klutz, in Berlin geboren. Ende 1943 zog meine Mutter nach Lausheim Krs. Waldshut. Dort besuchte ich die Volksschule von Ostern 1948 bis Ostern 1951. Das nächste Volksschuljahr verbrachte ich an der Helmholtzschule in Düsseldorf, da mein Vater Leiter der Werkgruppe Architektur an der dortigen Werkkunstschule geworden war.

Von Ostern 1952 bis Ostern 1955 besuchte ich das Geschw. Scholl-Gymnasium in Düsseldorf und von 1955 bis 1961 das Aloisiuskolleg in Bad Godesberg. Dort bestand ich das Abitur im Februar 1961. Von April 1961 bis September 1962 leistete ich den verlängerten Grundwehrdienst bei der Bundeswehr ab und wurde als Leutnant der Reserve entlassen. Im November 1962 begann ich mit dem Medizinstudium an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn, an der ich mein ganzes Studium verbrachte. Im März 1964 bestand ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung, im Oktober 1965 die ärztliche Vorprüfung und im Februar 1969 das Staatsexamen.

